

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290027

研究課題名(和文) 酸性糖鎖による神経発生制御機構の解明ーモルフォゲン活性調節を介してー

研究課題名(英文) Regulation of neural development by acidic sugar chains via modification of morphogen activity

研究代表者

池中 一裕 (IKENAKA, Kazuhiro)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授

研究者番号：00144527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ケラタン硫酸欠損マウスやヘパラン硫酸脱硫酸化酵素(Sulf)の変異マウスにおいて、胎生期脊髄ドメインが腹側へシフトするだけでなく、運動ニューロンの産生が亢進し、オリゴデンドロサイトの分化が抑えられた。Sulf1/2は胎生10日目まで底板に発現し、発生とともに背側へと発現が拡大した。これにより底板から分泌されるShhのシグナリングが変化した。ヘパラン硫酸を脱硫酸化することにより、結合しているShhが遊離され、背側に強いShhシグナルを入力すること、この強いShh入力により背側でShh, Sulf1および2の発現が誘導され、さらに背側にShhシグナルが入力されていくことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sulf1/2 are endosulfatases that remove sulfate from heparan sulfate. We found that Sulf2 modulates the cell fate change from motor neurons to oligodendrocyte precursor cells (MN-to-OPC) by regulating Shh signaling in the mouse ventral spinal cord in coordination with Sulf1. Sulf mRNAs colocalized with Shh mRNA and gradually expanded dorsally from E10.5 to E12.5, following strong Patched1 signals (induced by Shh). In the spinal cord of Sulf1 or 2 knockout (KO) mice, expression patterns of Shh and Patched1 differed from that of wild type mice. Moreover, the position of the ventral domains was shifted ventrally, MN generation prolonged, and OPC generation delayed at E12.5 in KO mice. These results demonstrated that in addition to Sulf1, Sulf2 also plays an important role in the MN-to-OPC fate change by regulating Shh signaling. Strong Shh signaling is induced when Shh is released by Sulf1/2, and this strong Shh input subsequently induces the dorsal expansion of Shh and Sulf1/2 expression.

研究分野：神経生物学

キーワード：糖鎖 神経科学 生理学 脳・神経 発生分化

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の神経発生においては様々なシグナル伝達のクロストークによって適切な細胞種が適切なタイミングで生み出される。胚発生に伴う形態形成では分泌性のシグナル分子を介した相互作用が細胞間コミュニケーションの一つの方法として用いられる。そのシグナル因子群としてモルフォゲンと呼ばれる分泌性因子がある。モルフォゲンは位置情報を担う分子で、一部の限局した細胞において生産され、周囲の細胞により受け取られることで分化などのパターン形成を引き起こす。拡散したモルフォゲンは濃度勾配を形成するため、位置情報に依存して分化運命が決定されると考えられている。モルフォゲンによる形態形成がよく解析されている組織の一つに、発生過程にある脊椎動物の脊髄が挙げられる。発生期の脊髄では、中心管近傍の細胞は背腹軸に沿って領域ごとに異なる転写因子を発現し、いわゆるドメイン構造を形成する。このドメイン構造は神経管最背側部の roof plate より分泌される Wnt1/3a、また最腹側部の notochord や床板より分泌される Shh(Sonic hedgehog)によって協調的に形成される。これらの因子はモルフォゲンとして働いて神経管中で濃度勾配を形成し、濃度依存的に転写因子の発現が決定される(Fausto et al., Cell Cycle, 2007)。しかしながら、この濃度勾配がどのように形成され維持されているのかについては不明な点が多い。これまでモルフォゲンは自然拡散によりなだらかな勾配を作っていると考えられてきた。しかし最近になって、ショウジョウバエの翅における Dpp の解析から、分泌されたモルフォゲン因子が細胞膜上の局所に限局して存在していることがわかった(Wartlick et al., Science, 2011)。これは従来のモルフォゲンに対する概念を覆すものであり、新たな概念の提示が求められる。つまり単純な拡散ではなく、細胞膜上にある特定の構造上に局在しながら拡散するというモデルである。このモデルを説明する上で重要なものに細胞表面の酸性糖鎖構造が考えられている。これまでモルフォゲンと酸性糖鎖構造との相互作用に関しての報告があるが (reviewed in Häcker et al., 2005, Nature)、神経系において神経幹細胞の分化に関わる情報はまだまだ不足しているのが現状である。

われわれは EGFP を融合した Wnt3a の存在下で E10.5 マウス脊髄のスライスカルチャーを行うと、背側の一部の領域に限局して結合することを見出している。内在的な Wnt3a は最背側の roof plate から分泌され拡散するが、外から加えた Wnt3a-EGFP も背側領域に限局することから、モルフォゲンが自律的に濃度勾配を形成するのではなく、モルフォゲン受容分子がモルフォゲンの結合する環境を整えて濃度勾配を形成していることが示唆された (未発表データ)。Wnt3a はコンドロイチン硫酸と結合することが知られて

いるため(Nadanaka et al., 2008)、そのような“場”には酸性糖鎖が重要であると考えられるが、神経系においてモルフォゲンと酸性糖鎖の関係性を解析した例は少ない。また、われわれはグリコサミノグリカン鎖の一つであるケラタン硫酸(KS)の欠損マウスで発生期脊髄のドメイン構造を解析したところ、E12.5 の段階でそれぞれのドメインが腹側へとシフトしている結果が得られている。このことは、酸性糖鎖が発生期において神経幹細胞からの時空間的に高度に制御された正常な形態形成に重要な役割を担っていることを示唆する結果である。

## 2. 研究の目的

本研究では、蛋白質の糖鎖修飾、特にグリコサミノグリカン鎖に着目して、モルフォゲン濃度勾配形成に果たす酸性糖鎖の役割を解明し、それによっていかに神経細胞の分化が制御されているのかを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

グリコサミノグリカン鎖の欠損マウスを用いて、発生期脊髄におけるモルフォゲンとグリコサミノグリカン鎖の相互作用を解析する。グリコサミノグリカン鎖とモルフォゲンの関係性を明らかにするために、遺伝子改変マウスにおいて Wnt や Shh の分布パターンを詳細に解析する。モルフォゲンの分布パターンが変化すれば脊髄のドメイン形成にも変化が生じると考えられるので、各ドメインの形成にどのような影響を及ぼすか調べる。そこから、発生における神経幹細胞の運命決定が、酸性糖鎖構造によってどのように制御されているか解明する。

## 4. 研究成果

モルフォゲン機能のよく知られているマウス脊髄を用い、発生期におけるモルフォゲンと酸性糖鎖の代表であるグリコサミノグリカン鎖の相互作用についてモルフォゲンの分布及びシグナリングへの影響に着目し解析した。

本研究でまず胎生期脊髄におけるケラタン硫酸の発現を調べたところ、高硫酸化されたケラタン硫酸が Floor plate や Notochord に集積していることから、Shh との相互作用が示唆された。そこでケラタン硫酸欠損マウスを用い、胎生期脊髄におけるドメイン構造及び細胞分化について解析を行なった。胎生期脊髄におけるドメイン構造に関して胎生 12.5 日においてドメイン構造の腹側へのシフトが観察された。特に Olig2 陽性となる pMN ドメインでは幅は変わらずに位置だけが腹側へ移動していた。加えて p2、p3 ドメインはその幅が有意に減少している事が明らかとなった。そこで Shh のシグナリングに着目しレポーター遺伝子である Patched1 の発現を調べるとその発現パターンに変化が観ら

れることが分かった。このことからケラタン硫酸の欠損により Shh シグナリングパターンの変化が起こり、その結果としてドメイン構造が腹側へシフトしたものと考えられる。次にドメイン構造のシフトが細胞分化に与える影響につき検討した。特に pMN ドメインは発生初期に運動ニューロンを産生するが、胎生 12.5 日からオリゴデンドロサイト前駆細胞の産生へと変化する。そこで胎生 12.5 日におけるオリゴデンドロサイトの分化について解析を行なったところ、ケラタン硫酸欠損マウスにおいて前駆細胞の数が著しく減少している事が明らかとなった。この減少は胎生 14.5 においても観察されるが、生後までには回復している事も分かった。よってケラタン硫酸の欠損により胎生期オリゴデンドロサイトの発生が遅れる事が明らかとなった。一方で、同じく pMN ドメインより産生される運動ニューロンについて調べたところ、胎生 12.5 日ケラタン硫酸欠損マウスにおいて運動ニューロン産生が続き、過剰な運動ニューロンが存在している事も明らかとなった。過剰に産生されたモーターニューロンは、胎生 14.5 日にアポトーシスもしくはミクログリアによる貪食によってその数が調整されていた。pMN ドメインにおけるこれらの表現系は運動ニューロン産生からオリゴデンドロサイト前駆細胞産生へスイッチングの遺伝子制御異常によるものと考えられる事から関連遺伝子の発現を調べた。すると、オリゴデンドロサイトの分化誘導因子である Nkx2.2:Olig2 ダブルポジティブとなる細胞の割合が有意に減少していた。対照的に、モーターニューロンの分化誘導因子である Neurogenin2:Olig2 ダブルポジティブとなっている細胞の割合が有意に増加していることが明らかとなった。よってケラタン硫酸欠損により pMN ドメインにおけるモーターニューロン産生からオリゴデンドロサイト産生へのスイッチングが遺伝子発現制御異常により遅れていることが分かった。

以上の結果よりケラタン硫酸欠損マウスにおいて観察されたドメインのシフトや pMN ドメインにおける分化の遅れは、ケラタン硫酸欠損により Shh シグナリングに異常が生じ、発生・分化関連遺伝子の異常を誘導することであると示された。

平成 26 年度はその他のヘパラン硫酸 (sulfatase (sul f) 1/2-KO)・コンドロイチン硫酸の変異マウス (GalNAc(4,6)ST-1-KO) においても同様の解析を行い、ドメイン構造を評価した。GalNAc(4,6)ST-1-KO マウスにおいては野生型と比較して、有意な差は認められなかったが、sul f1/2-KO マウスにおいてはケラタン硫酸欠損マウスのように胎生 12.5 日でドメインの腹側へのシフトが認められた。また、オリゴデンドロサイト産生の遅れも同様に認められた。この結果は、ケラタン硫酸とヘパラン硫酸が相互作用してモルフォゲンの分布に影響を与えていることを示唆し

ており、新たな研究概念を提起した。

次いでその機構について詳細な解析を行った。まず胎生期脊髄における Sulf2 の発現パターン変化を経時的に解析した。Sulf2 の発現は高発現領域と低発現領域に分けられ、低発現領域は脊髄全体に広がっていた。一方 Sulf2 の高発現領域は Sulf1 の発現パターンと完全に重複していた事から、Sulf2 は胎生期脊髄の発生において Sulf1 と重複する機能の他に、それとは別の機能も有することが示唆された。また、floor plate から産生された Shh がその背側領域に Shh と Sulf1/2 発現を誘導し、この誘導によりさらにそこから背側領域へ Shh のシグナルが入力されることも示唆された。

これらを証明するために Sulf 遺伝子欠損マウスを用いた。Sulf1 欠損マウス (Sulf1 KO) においては運動ニューロンからオリゴデンドロサイト産生へのスイッチングが遅れることが報告されているが、われわれはなぜ同じ領域に重複して発現している Sulf2 が代償できないかについて検討した。まず、Sulf1 欠損マウス (Sulf1 KO) において mRNA とタンパク質レベルにおける Sulf2 の発現パターンを調べたところ、野生型と差がなかった。次に in vitro のサルファターゼ活性の解析を行ったが、Sulf1 と Sulf2 は活性上相互作用がなく、独立していることが明らかとなった。これらの結果よりわれわれは「運動ニューロンからオリゴデンドロサイト産生スイッチングに十分な Shh シグナリングを pMN ドメインに入力するためには Sulf1 と Sulf2 両方の活性が必要であり、ある一定以上の HSPG の 6 位硫酸基が除去されなければならない。」との仮説を提唱した。このことは Sulf1 欠損マウス、Sulf2 欠損マウス、Sulf1・Sulf2 ダブル欠損マウスとダブルヘテロマウス全において同様なフェノタイプを示したことから証明された。すなわち、上記 4 種の動物すべてにおいて floor plate 背側の p3 ドメインにおいて Shh の誘導が認められず、Shh シグナリングが胎生 11.5 日齢から 12.5 日齢パターンへの変化が認められなかった。このことは shh シグナリングの背側への移行が途中で止まってしまっていることを意味する。以上の結果より、運動ニューロン産生からオリゴデンドロサイト産生へのスイッチングにはある一定以上の 6 位硫酸基が切断されることが必要であり、このことによって初めて充分量の Shh 遊離が誘導可能となることが示された。

このように脊髄発生においてグリコサミノグリカンの構造変化を通してモルフォゲンの濃度制御が行われ、細胞分化が制御されていることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Jiang W, Ishino Y, Hashimoto H, Keino-Masu K, Masu M, Uchimura K, Kadomatsu K, Yoshimura T, Ikenaka K. Sulfatase2 Modulates Fate Change from Motor Neurons to Oligodendrocyte Precursor Cells through Coordinated Regulation of Shh Signaling with Sulfatase1. Dev Neurosci. (2017) 印刷中 査読有  
doi: 10.1159/000464284.

Hashimoto H, Ishino Y, Jiang W, Yoshimura T, Takeda-Uchimura Y, Uchimura K, Kadomatsu K, Ikenaka K. Keratan Sulfate Regulates the Switch from Motor Neuron to Oligodendrocyte Generation During Development of the Mouse Spinal Cord. Neurochem Res. (2016) 41:450-462 査読有  
doi: 10.1007/s11064-016-1861-9.

成瀬雅衣、池中一裕、等 誠司 大脳皮質オリゴデンドロサイトの起源 生体の科学 (2015) 66:541-545 査読無  
<http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.1147/7/mf.2425200346>

Naruse M, Ishino Y, Kumar A, Ono K, Takebayashi H, Yamaguchi M, Ishizaki Y, Ikenaka K, Hitoshi S. The Dorsoventral Boundary of the Germinal Zone is a Specialized Niche for the Generation of Cortical Oligodendrocytes during a Restricted Temporal Window. Cereb Cortex. (2015) 26:2800-2810 査読有  
doi: 10.1093/cercor/bhv141.

Takebayashi H, Ikenaka K. Oligodendrocyte generation during mouse development. Glia. (2015) 63:1350-1356. 査読有  
doi: 10.1002/glia.22863.

〔学会発表〕(計8件)

吉村武、林明子、内村健治、門松健治、矢木宏和、加藤晃一、馬場広子、池中一裕 「GlcNAc6ST-1 は N 結合型糖鎖の硫酸化を介して末梢神経系の髄鞘形成を制御する」 第34回日本糖質学会 2015年7月31日 東京大学(東京都文京区)

橋本弘和、江文、Jinwoong Bok、池中一裕 「胎生期脊髄の発生におけるプロテオグリカンネットワークの役割」 第34回日本糖質学会 2015年7月31日 東京大学(東京都文京区)

橋本弘和、江文、Jinwoong Bok、池中一裕

「胎生期脊髄の発生におけるプロテオグリカンネットワークの役割」 第79回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 2015年5月23日 信州大学(長野県松本市)

池中一裕 「オリゴデンドロサイト発生におけるプロテオグリカンの関与」 金沢大学薬学シンポジウム 2014~グリアワールドへのいざない~(招待講演) 2014年12月4日 金沢大学角間キャンパス(石川県金沢市)

池中一裕 「Regulation of oligodendrocyte development by proteoglycans」 International Conference on Frontiers in Comparative Endocrinology and Neurobiology -2014 (招待講演) 2014年11月25日 ハイデラバード(インド)

池中一裕 「Regulation of oligodendrocyte development by proteoglycans」 First Meeting of the DFG Priority Program 1757 (招待講演) 2014年10月13日 デュッセルドルフ(ドイツ)

橋本弘和、石野雄吾、江文、吉村武、内村佳子、内村健治、門松健治、池中一裕 「ケラタン硫酸による Shh シグナリングを介した胎生期脊髄の発生制御」 第33回日本糖質学会 2014年8月10日 名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)

江文、石野雄吾、橋本弘和、枅和子、枅正幸、池中一裕 「Sulfatase KO マウスにおける胎生期脊髄オリゴデンドロサイトの発生異常」 第33回日本糖質学会 2014年8月10日 名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

池中一裕 (IKENAKA, Kazuhiro)  
生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授  
研究者番号: 00144527

(2)研究協力者

吉村武 (YOSHIMURA, Takeshi)  
大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・助教  
研究者番号: 60402567

石野雄吾 (ISHINO, Yugo)

橋本弘和 (HASHIMOTO, Hirokazu)

江文 (JIANG, Wen)